动 物 学 研 究 2010，Dec. 31(6): 581−586 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2010.06581

鲤 EST 标记与耐低温性状的相关性分析及定位

常玉梅[1]，高国强[1,2]，徐丽华[1,2]，刘金亮[1,2]，刘春雷[1,2]，梁利群[1,*]

(1. 中国水产科学研究院 黑龙江水产研究所, 黑龙江 哈尔滨 150070; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306)

摘要：利用 GLM 模型对 12 个表达序列标签(expressed sequence tag, EST)标记的基因型与鲤耐低温性状进行相关性分析, 然后使用 OneMap 软件将这些 EST 标记进行连锁定位研究, 并通过 Blast x 搜索引擎对这些候选 EST 进行注释。结果显示, EST 标记 CC009 (P<0.05)和 CC115(P<0.01)与鲤鱼耐低温性状显著相关; 12 个 EST 标记中有 8 个标记分别连锁定位到 6 个连锁群中, 其中与耐低温相关的 CC009 和 CC115 分别定位到鲤连锁图谱的第 38 号连锁群和第 2 号连锁群; 蛋白质数据库同源性比对发现, CC009 与斑马鱼(*Danio rerio*)尿嘧啶激酶 1(uridine-cytidine kinaseI)的同源性高达 94%; 而 CC115 为原绿球藻(*Prochlorococcus marinus str*)的假定糖基转移酶(putative glycosyl transferase)的同源性为 56%。

关键词：鲤鱼; 表达序列标签; 耐低温; 相关分析; 连锁图谱
中图分类号：Q959.468; Q343.1; Q311.8; Q16; Q958.1124 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2010)06-0581-06

Correlation and location of EST markers with cold tolerance trait of common carp (*Cyprinus carpio* L.)

CHANG Yu-Mei[1], GAO Guo-Qiang[1,2], XU Li-Hua[1,2], LIU Jin-Liang[1,2], LIU Chun-Lei[1,2], LIANG Li-Qun[1,*]

(1. *Heilongjiang River Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Harbin* 150070, *China*; 2. *College of Fisheries and Life Sciences*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: Expressed sequence tags (ESTs) are parts of complementary DNAs (cDNAs) with certain gene function．It provides us more information than other neutral markers. The association of EST markers with phenotypes can increase our understanding of the biochemical pathways and mechanisms affecting economically important traits. In this study, 12 candidate EST markers isolated from the cold-induced brain cDNA of common carp (*Cyprinus carpio* L.) were conducted the correlation analysis of marker and cold tolerance trait of common carp using GLM model of SPSS 17.0 software firstly, then tried to locate them in the genetic linkage map using OneMap software. As a result, eight out of 12 candidate EST makers were separately located in six linkage groups, in which marker CC009(P<0.05) and CC115 (P<0.01) were associated with cold tolerance and mapped to LG38 and LG2, respectivey. Homology identity alignments showed that marker CC009 was highly homologous to the known Uridine-cytidine kinase I of *Danio rerio* with an identity of 94%, and marker CC115 was lowly homologous to the putative glycosyl transferase of *Prochlorococcus marinus* with an identity of 56%.

Key words: Common carp; Expressed sequence tag; Cold tolerance; Correlation analysis; Linkage map

对于一些优良的经济鱼类来说, 如何克服水域分布的限制, 扩大养殖范围, 进一步提高经济效益, 温度是决定其地域分布的主要限制因子。早期对鱼类耐低温的研究侧重于抗冻蛋白(antifreeze protein, AFP)的研究, AFP 是 Devries (1971)在 Notothenioid 鱼的血液中首次发现的。随着分子生物学的发展和基因工程的日渐完善, AFP 得到了空前的应用。Jiang et al (1990)克隆了黄盖鲽(*Pseudopleuronectes yokohamae*)抗冻蛋白基因。Zhang et al(2009)克隆了大黄鱼类 Ⅳ 型抗冻蛋白基因, 并进行了表达和功

收稿日期：2010-07-13；接受日期：2010-10-20
基金项目：国家重点基础研究发展计划“973”(2010CB126305); 农业部水产生物技术重点开放实验室(2009NYBZS-05); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2009HSYZX-SJ-05)
*通讯作者(Corresponding author)，E-mail: lqliang@fishbreeding.org
第一作者简介：常玉梅, 女, 助理研究员, 博士, 研究方向：鱼类分子生物学与基因工程育种。E-mail：ymchang@fishbreeding.org

能研究。Zhu et al (1997)利用转基因技术，制备了转抗冻蛋白基因鲮鱼，但是并没有成功培育出耐低温转抗冻蛋白基因鱼品种。国内外诸多学者已经对一些优良的经济鱼类进行温度适应机制研究，如罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 的不耐低温；虹鳟 (*Oncorhynchus mykiss*)的不耐高温研究等，但是由于罗非鱼和虹鳟是狭温性鱼类，大部分研究多是从生理、生化角度进行探索(Yamashita et al, 1996; Li et al, 2002; Atwood et al, 2003; Perry et al, 2005; Diegane et al, 2007)，因而关于鱼类的耐低温适应机制的分子遗传基础尚不明了。Liang et al(1997)初步建立了适于进行鲤鱼低温适应性分析的实验鱼体系：荷包红鲤抗寒品系(*Cyprinus carpio wuyuanensis*)(♂)和云南大头鲤(C. *pellegrini* Tchang) (♀)，构建了适于鲤鱼耐低温研究的 F_2 家系，并且通过低温诱导实验建立了消减 cDNA 文库(Liang et al, 2006)，获得了约 350 个低温诱导表达的基因序列，这为研究鱼类低温适应机制打下坚实的遗传基础。

表达序列标签(expressed sequence Tag, EST)是对 cDNA 文库随机克隆测序获得的 cDNA 序列片段，是一个完整基因的一小部分，它代表生物体某种组织某一时期的基因表达(Hatey et al, 1998)。EST 作为表达序列所在区域的分子标签，因编码 DNA 序列高度保守而具有自身的特殊性质，与来自非表达序列的标记(如 AFLP、RAPD、SSR 等) 相比，更可能穿越家系与种的限制。因此，EST 标记在亲缘关系较远的物种间进行比较基因组连锁图和比较质量性状信息特别有用，在基因组进化研究领域有着广阔的应用前景。近年来，EST 标记愈来愈多地受到重视，在模式鱼类斑马鱼(*Danio rerio*)和青锵(*Oryzias latipes*)中，已有大量 EST 标记成功用于构建遗传图谱和比较基因组作图(Woods et al, 2000; Song et al, 2003)；在太平洋牡蛎(*Oysters crassostre*)(Liu et al, 1999)、斑节对虾(*Penaeus monodon*)(Yu et al, 2003)、斑点叉尾鮰(*Ietalurus Punetaus*)(Naruse et al, 2004)和鲤鱼(Wang et al, 2008)等水产经济动物中也有关于 EST 标记的报道。本研究通过对 12 个鲤鱼脑组织 EST 标记与低温性状进行相关分析，并尝试将 12 个基因标记在鲤遗传图谱上进行连锁定位，以期为今后研究鲤鱼耐低温性状的 QTL(数量性状基因座)精细定位和分子标记辅助育种研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验鱼均采自于黑龙江水产研究所松浦实验站。作图群体为 F_2 家系：祖父母分别为荷包红鲤抗寒品系(♂)和云南大头鲤(♀)，经过杂交得到 F_1，F_1 自交获得 F_2。约 1 000 尾 1 龄 F_2 个体进行物理标记后，放入松浦实验站越冬池进行 6 个月的室外越冬实验。翌年春出池发现只有 73 尾成活个体。本研究实验样本由 51 尾死亡个体和 59 尾成活个体，共计 110 个个体组成。

1.2 模板 DNA 提取

剪取适当大小无水乙醇固定的鲤鱼尾鳍，双蒸水洗涤 3～4 次，每次间隔约 10 min。待乙醇全部挥发后，用滤纸吸干水分，转入新管；每管加入 200 μL 新鲜配制的组织裂解液(成份：200 μg/mL 蛋白酶 K, 0.5%十二烷基肌氨酸钠, 10 mmol/L EDTA)；于 50℃的保温箱中消化 3～4 h，期间缓慢地上下颠倒 1～2 次。消化后的样品加入等体积的苯酚/氯仿/异戊醇(25∶24∶1)，缓慢抽提 3 次；2 倍体积预冷的无水乙醇沉淀，并用 70%乙醇洗涤两次；干燥后的 DNA 沉淀加入适量的 TE 溶解，并于 4℃保存备用。

1.3 EST 标记的来源

选取鲤鱼脑 cDNA 文库获得低温诱导表达的 350 个基因序列，根据 EST 序列非翻译区(UTR)引物设计原则，用 Primer3.0 软件共设计 64 对引物，其中 35 对获得清晰的扩增条带，12 对引物有多态性，其引物信息见表 1。

1.4 多态 EST 标记的 PCR 扩增及产物检测

用 12 对 EST 标记引物对鲤 F_2 家系的 110 个个体进行基因组扩增。PCR 反应体系：DNA 模板 2 μl (5 ng/μL)，自制 buffer 10.8 μL(含 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 100 μg/mL 的明胶, 4 种 dNTP100 μmol/L，上、下游引物(10 μmol /L)各 0.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1U(MBI)，灭菌去离子水补至总体积 15 μL。

所有 PCR 反应均在 9700 PCR 热循环仪上进行(ABI)。PCR 反应条件为：94℃预变性 3 min; 94℃ 30 s, 58～60℃ 30 s (表 1), 72℃ 30 s, 28 个循环; 72℃ 7 min。

PCR 扩增产物采用 10%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。电泳完毕后，参考 Ji et al(2008)报道的方法进行银染，扫描后保存图像。

表 1　鲤 12 对多态性 EST 标记引物
Tab. 1　A set of 12 ploymorphic EST primers of common carp

EST 标记 EST Makers	GenBank_登录号 GenBank_Accn	引物序列 5'−3' Primer sequence 5'−3'	产物大小(bp) Product size	退火温度(℃) Annealing temperature
CC007	HO651666	F:TCTGGTAATGGCACAGTGGA R:TGTTCCTCTCGCTTACAGCA	275	60
CC009	HO651666	F:ACATCAGCGGGATACACACA R:GTGTCAGACGCTGAAGGACA	111	60
CC030	HO651668	F:ACCGAGGAACATCAACTGCT R:GGCCGACGTTTTGTCTTTTA	158	60
CC062	FF677502	F: GCCGCCAACATTTTTCTAA R:GTGGGCAGATTGTTGGACTT	194	60
CC064	HO651669	F:AACTTCCCAAACTGTGCC R:TTCCAGCGGTGATGACTA	261	60
CC094	HO651670	F:CACCGAGATCGATGACACAG R:TGAGGGAATGTGGATGTCTG	284	60
CC095	HO651671	F: CCTGCTGCCCATAACAAAAT R:CGTTGCATTCCAAAATCAAA	457	60
CC112	HO651672	F:GGTGCCTGTTCCCTAAACAA R:ATGCTGTGTGTGCCAGGTAG	632	60
CC113	HO651673	F:GCAATGCAGAAACCAAAGGT R:TCATTTGTTGGTGCTGGTGT	293	60
CC115	HO651674	F:ACAAAATGGAGGTGGCAAAG R:ATCGGCTCATTGAAAGTGCT	237	60
CC143	HO651675	F:GTGTGTATGCCACCATGAGC R:CCAGACACACAGCTTCCAGA	165	59
CC147	HO651676	F: TCCAGCTCCACCAGAAGAGT R: TTCAGCTTTGGTTGCTGTTG	488	58

1.5　数据处理

1.5.1　相关性检验　对 12 个候选基因标记的基因组扩增结果分析，按照 Wu et al (2002)所报道的标记分离类型进行基因型分析，然后利用 SPSS17.0 统计软件的一般线性模型(GLM)进行标记的基因型和性状的相关性分析。模型如下：$y=u+gi+e$, u 表示群体均值, gi 表示第 i 个基因型的效应, e 为残差, 采用 permutation 确定基因型效应的显著性水平(1 万次)。

1.5.2　OneMap 定位分析　同样，将以上述方法进行基因型分析的 12 对 EST 标记的数据，通过 OneMap 作图软件与此鲤 F_2 家系的遗传连锁图谱使用过的 911 个 fAFLP 标记重新进行连锁定位(Gao et al, 2010)。

1.5.3　同源性比较　使用 NCBI 中的 Blastx 搜索引擎将 12 条基因序列与蛋白质数据库进行同源性比较。

2　结果与分析

2.1　EST 标记与低温性状的相关性分析

通过 SPSS17.0 软件对 12 个候选 EST 标记与鲤鱼耐低温性状进行相关性分析。结果显示，标记 CC009 与耐低温性状相关性达到显著水平(P<0.05); 标记 CC0115 与耐低温性状相关性达到极显著水平(P<0.01)，其他 10 个标记与性状无明显关联(表 2)。

2.2　EST 标记在鲤遗传连锁图谱上的定位结果

借助 F_2 群体的遗传连锁图谱使用的 AFLP 标记，将 12 个 EST 标记进行连锁定位分析。结果显示，有 8 个标记分别连锁定位到 6 个连锁群，其中标记 CC143 和 CC147 定位到第 7 号连锁群；标记 CC030 定位到第 8 号连锁群；标记 CC007 和 CC064 定位到第 31 号连锁群；标记 CC112 定位到第 33 号连锁群；而与鲤鱼耐低温性状显著相关的标记 CC115 和标记 CC009 分别被连锁定位到图谱的第 2 号连锁群与第 38 号连锁群(图 1)。

2.3　EST 序列同源性比对结果

使用 Blast x 搜索引擎将 12 个基因标记与 NCBI 网站中的蛋白质数据库进行同源性比较，结果显示，标记 CC009 与斑马鱼(*Danio rerio*)尿嘧啶激酶 1(uridine-cytidine kinaseI)的同源性水平高达 94%，而标记 CC0115 为原绿球藻(*Prochlorococcus marinus str*)的假定糖基转移酶(putative glycosyl transferase)，同源性为 56%，标记 CC113 为大西洋鲑的溶质载体 22 号家族 2 号成员；标记 CC143 为

表 2 12 个候选基因标记与鲤低温性状的相关性分析结果

Tab. 2 The correlation analysis of 12 EST candidates and cold tolerance of common carp

EST 标记 Marker	平方和 Sum of squares	自由度 df	均方 Mean square	*F* 值 *F* value	*P* 值 *P* value
CC007	0.174	2	0.087	0.343	0.710
CC009	1.361	1	1.361	5.656	0.019*
CC030	0.369	2	0.185	0.732	0.483
CC062	0.070	2	0.035	0.138	0.872
CC064	0.606	2	0.303	1.213	0.301
CC094	0.713	2	0.356	1.431	0.244
CC095	0.208	2	0.104	0.411	0.664
CC112	0.945	2	0.473	1.915	0.152
CC113	0.687	2	0.344	1.379	0.256
CC115	8.912	1	8.912	52.185	0.000**
CC143	0.443	2	0.221	0.880	0.418
CC147	0.872	1	0.872	3.558	0.062

*P<0.05; **P<0.01。

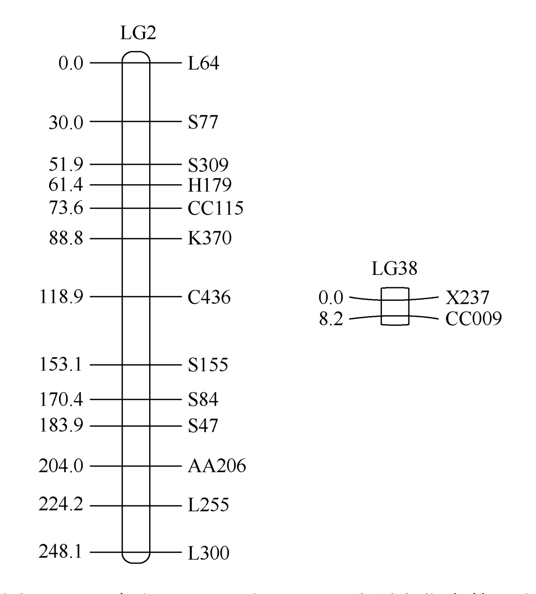


图 1 EST 标记 CC115 和 CC009 分别定位在第 2 和第 38 号连锁群上

Fig. 1 EST marker CC115 and CC009 mapped to LG2 and LG38 individually

斑马鱼的 G 蛋白偶联受体, 其它标记均为假定蛋白和未知序列。

3 讨 论

鱼类的耐低温性状是鱼类的主要经济性状之一, 对于一些优良的喜温性鱼类如何克服分布水域的限制, 尤其是北方温带水域, 成为鱼类生物学家面临的巨大挑战。近几年来, 国内学者对鲤鱼的耐低温性状做了大量研究, 在耐低温机理上也取得了很大的进展。已有研究表明, 低温胁迫可能打破实验鱼血清离子的稳态, 而这种稳态的存在是为了保证细胞表面某些特定分子的正常功能(Burton et al, 1996; Chang et al, 2006a; Chang et al, 2006b); 另外, 本课题组成员亦从冷诱导基因表达方面做了大量研究, 筛选出约有 350 个耐低温相关的候选基因, 并对其中的多个基因进行了表达差异分析, 结果表明基因在表达量上与鲤鱼的耐低温性状相关, 而且某些基因存在组织特异性(Li et al, 2008; Liang et al, 2009; Li et al, 2009); Liang ＆ Sun (2003)首次应用 RAPD 技术获得了 10 个与鲤耐寒性状相关的分子标记, 且将其中的 1 个标记定位在鲤第 5 号连锁群上, 随后 Pan et al(2008)又鉴定了 2 个与鲤耐寒性状相关的 SSR 标记, 这些标记的开发及应用将推动鲤鱼耐低温新品种的培育。由于 EST 序列是从 cDNA 文库随机克隆测序而来的, 它能够比其他分子标记提供更多的信息, 在基因定位和克隆、分子标记辅助育种方面具有其他标记无法比拟的优势(Cato et al, 2001)。因此, 本研究将前期低温诱导获得的鲤 EST 序列作为标记, 以期通过扫描越冬成活个体和死亡个体的基因组, 进一步鉴定耐寒相关候选基因。结果有 2 个 EST 标记与鲤鱼耐低温性状显著相关, 并将两者成功地定位在了鲤遗传连锁图谱上, 这对今后的耐低温性状 QTL 的精确定位以及与耐低温相关基因的克隆提供一定的依据。虽然其余 10 个标记未能检测出相关性, 但有 6 个标记被定位到了遗传图谱上, 提高了图谱的分辨率, 而且 EST 标记属于基因标记, 进一步提高了鲤遗传连锁图谱的

精确度。

本实验得到的两个与耐低温性状相关的标记 CC009(P<0.05)和标记 CC0115(P<0.01)通过 Blast x 进行功能比对，发现其分别编码尿嘧啶激酶 1 和假定糖基转移酶。尿嘧啶激酶在核酸代谢的尿嘧啶补救途径中发挥重要作用，尿嘧啶核苷酸激酶的作用是将三磷酸腺苷酸(ATP)上的磷酸基团转移到尿嘧啶核苷酸(UMP)上，最终形成双磷酸尿嘧啶核苷酸(UDP)及双磷酸腺苷酸(ADP)(Wang et al, 2002)，其核酸代谢途径中也有 ATP 能量的转化，由此推测，鲤鱼在低温胁迫时，尿嘧啶核苷酸激酶通过核酸代谢参与了能量的转化，可能对鲤鱼适应低温环境起着一定的作用。糖基转移酶是糖基化过程的关键酶，在生物体内催化活化的糖连接到不同的受体分子，如蛋白、核酸、寡糖、脂和小分子上，糖基化的产物具有很多生物学功能(Dai et al, 2007)，如参与细胞识别、信息传递、激素调节、发育、细胞分化、神经系统和免疫系统调节等各个方面。另外，糖基转移酶的表达和细胞周期密切相关。在细胞分化阶段，许多糖基转移酶的基因是表达的，为此出现了一系列糖类异质体作为分化抗原，一旦发育成熟，在细胞表面出现了另一些糖类异质体。如果糖基转移酶在成熟细胞中活性很高，就会产生癌变，同时出现了早期的分化抗原，因此一些糖基转移酶活性被视为肿瘤的重要标志(Yang et al, 1997)。假定糖基转移酶与鲤的耐低温性状极显著相关说明低温下鱼机体糖基化作用加强，信号通路、神经系统调节、内分泌系统调节等生化途径活跃起来，而且有可能会牺牲鱼体的某些生理功能，来应对低温刺激，但是具体的调节机制和调节通路还有待深入研究。

参考文献：

Atwood HL, Tomasso JR, Webb K, Gatlin DM. 2003. Low-temperature tolerance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*: Efforts of environmental and dietary factors [J]. *Aquacult Res*, **34**: 241-251.

Burton RF. 1996. The dependence of normal arterial blood pH on sodium concentration in teleost fish [J]. *Comp Biochem Physiol*, **114**A(2): 111-116.

Burton RF. 2002. Evolutionary determinants of normal arterial plasma pH in ectothermic vertebrates [J]. *J Exp Biol*, **205**: 641-650.

Cato SA, Gardner RC, Kent J, Richardson TE. 2001. A rapid PCR-based method for genetically mapping ESTs [J]. *Theor Appl Genet*, **102**: 296-306.

Chang YM, Kuang YY, Cao DC, Liang LQ, Sun XW, Lei QQ. 2006b. Effects of cooling temperature stress on hematology and serum chemistry values of *Cyprinus carpio* [J]. *J Fish Sci Chn*, **30**(5): 701-706. [常玉梅，匡友谊，曹鼎臣，梁利群，孙效文，雷清泉. 2006b. 低温胁迫对鲤血液学和血清生化指标的影响. 水产学报, **30**(5): 701-706.]

Chang YM, Liang LQ, Sun XW, Cao DC, Lei QQ. 2006a. The changes of serum pH values of common carp during cooling temperature [J]. *J North Agrc Univ*, **37**(3): 357-36. [常玉梅，梁利群，孙效文，曹鼎臣，雷清泉. 2006a. 低温鲤鱼血清 pH 值的变化. 东北农业大学学报, **37**(3): 357-36.]

Dai HQ. Wang HX, Shen YM. 2007. Recent advances in antibiotic glycosyltransferases [J]. *Chn J Antibiot*, **32**(5): 257-262. [代焕琴，王浩鑫，沈月毛. 2007. 抗生素糖基转移酶研究进展. 中国抗生素杂志, **32**(5): 257-262.]

Devires AL. 1971. Glycoproteins as biological antifreeze agents in Antarctic fishes [J]. *Science*, **172** (3988): 1152-1155.

Diegane ND, Chen YY, Lin YH, Vaseeharan B, Chen JC. 2007. The immune response of tilapia *Oreochromis mossambicus* and its susceptibility to *Streptococcus iniae* under stress in low and high temperatures[J]. *Fish Shellfish Immunol*, **22**(6): 686-694.

Gao GQ, Chang YM, Kuang YY, Liang LQ. 2010. The construction of genetic linkage map of common carp (*Cyprinus carpio* L.) using OneMap software [J]. *J Fish Sci Chn,* **34**(5): 649-654. [高国强，常玉梅，匡友谊，梁利群. 2010. 利用 OneMap 软件构建鲤遗传连锁图谱. 水产学报, **34**(5): 649-654.]

Hatey F, Tosser-Klopp G, Clouscard-martinato C, Mulsant P, Gasser F. 1998. Expressed sequenced tags for genes: A review [J]. *Genet Select Evol*, **30**: 521-541.

Ji X, Sun XW, Yang LG, Li YJ, Liu HJ. 2008. Paternity testing of mitogynogenetic Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) using microsatellite loci [J]. *Zool Res*, **29**(1): 25-30. [季旭，孙效文，杨立更，李雅娟，刘海金. 2008. 微卫星标记对牙鲆有丝分裂雌核发育家系的亲子鉴定. 动物学研究, **29**(1): 25-30.]

Jiang YQ, Chen XF, Liu PT, Zhang NC. 1990. Study on antifreeze protein in fishes II. The cloning of antifreeze protein gene cDNA of pseudopleuronectes yokohamae and its expression in *E.coil* [J]. *J. Genet. Genomics*, **17**(3) 202-210. [蒋耀青，陈雄风，刘澎涛，张乃昌. 1990. 鱼类抗冻蛋白的研究 II. 黄盖鲽抗冻蛋白基因 cDNA 的克隆及其在大肠杆菌中的表达. 遗传学报, **17**(3) 202-210.]

Li SF, Li CH, Dey M, Gagalac F, Dunham R. 2002. Cold tolerance of three strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, in China [J]. *Aquaculture*, **213**: 123-129.

Li Y, Ding L, Li Y, Hou N, Chang YM, Liang LQ , Lei QQ. 2008. Influence on the expression quantity of five genes in the different tissues of common carps Cyprinus carpio under the low temperature[J]. *Acta Zool Sin*, **54**(3): 460-466. [李勇，丁雷，李言，侯宁，常玉梅，梁利群，雷清泉. 2008. 低温对鲤鱼的 5 个基因在不同组织中表达量的影响. 动物学报, **54**(3): 460-466.]

Li Y, He W, Ding L, Li Y, Liang LQ, Lei QQ. 2009. Construction and identification of cDNA library from common carp(Cyprinus carpio Linnaeus) brain [J]. *J Fish Sci Chn*, 16(2): 147-155. [李言，何薇，丁雷，李勇，梁利群，雷清泉. 2009. 鲤脑组织 cDNA 文库的构建及脑室管膜素基因鉴定. 中国水产科学, **16**(2): 147-155.]

Liang LQ, Chang YM, Zou QW, Lei QQ. 2009. Cloning and correlation analysis of cold adaptation of NADH—quinone oxidoreductase 3 subunit gene from common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *J Jishou Univ: Nat Sci ed*, **30**(5): 77-81. [梁利群，常玉梅，邹庆薇，雷清泉. 2009. 鲤 NADH 泛醌氧化还原酶亚基 3 基因的克隆及低温适应相关性分析. 吉首大学学报：自然科学版, **30**(5): 77-81.]

Liang LQ, Li SW, Chang YM, Gao JS, Sun XW, Lei QQ. 2006. Application

of suppression subtractive hybridization (SSH) to study of cold tolerance in common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *J Fish Sci Chn*, **13**(2): 193-199. [梁利群, 李绍戊, 常玉梅, 高俊生, 孙效文, 雷清泉. 2006. 抑制消减杂交技术在鲤鱼抗寒研究中的应用. 中国水产科学, **13**(2): 193-199.]

Liang LQ, Sun XW, Shen JB, Yan XC. 1997. RAPD analysis for the character of cold tolerance of the common carp [J]. *J Fish Sci Chn*, **4**(3): 89-91. [梁利群, 孙效文, 沈俊宝, 闫学春. 1997. 鲤鱼抗寒性状的 RAPD 分析. 中国水产科学, **4**(3): 89-91.]

Liang LQ, Sun XW. 2003. Mapping cold tolerance strain on genetic linkage map of common carp [J]. *J Dalian Fish Univ*, **18**(4): 278-281. [梁利群, 孙效文. 2003. 鲤耐寒性状分子标记在遗传连锁图上的定位. 大连水产学院学报, **18**(4): 278-281.]

Liu ZJ, Karsi A, Dunham RA. 1999. Development of polymorphic EST markers suitable for genetic linkage mapping of catfish[J]. *Mar Biotechnol*, **1**: 437- 447.

Naruse K, Tamka M, Mita K, Shima A, Postlethwait J, Mitani H. 2004. A medaka gene map: the trace of an cestral vertebrate proto chromosomes revealed by comparative gene mapping [J]. *Genome Res*, **14**: 820-828.

Pan X, Liang LQ, Lei QQ. 2008. Selection of microsatellite molecular markers associated with the character of cold tolerance of common carp[J]. *J Harbin Inst Technol*, **40**(6): 915- 918. [潘贤, 梁利群, 雷清泉. 2008. 筛选与鲤鱼抗寒性状相关的微卫星标记. 哈尔滨工业大学学报, **40**(6): 915- 918.]

Perry GML, Martyniuk CM, Ferguson MM, Danzmann RG. 2005. Genetic parameters for upper thermal tolerance and growth-related traits in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. *Aquaculture*, **250**(1-2): 120-128.

Song W, Chen XY, Xu JR, Zhang ZY. 2003. Research progress in forest tree genetic linkage map construction and its future prospects [J]. *Hereditas*, **25**(6): 749-756. [宋婉, 陈晓阳, 续九如, 张志毅. 2003. 林木遗传连锁图谱构建研究进展与发展方向. 遗传, **25**(6): 749-756.]

Wang CY, Yu XM, Tong JG. 2008. Development and characterization of polymorphic EST markers in common carp [J]. *Acta Hydrobiol Sin*, 32(2): **207**-212. [王春艳, 俞小牧, 童金苟. 2008. 鲤鱼多态性EST标记的筛选与特性分析. 水生生物学报, 32(2): **207**-212.]

Wang JY, Zhu SG, Xu CF. 2002. Biochemistry: Next volume[M]. 3rd ed. Beijing: High Education Publishing House, 391-398. [王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 2002. 生物化学: 下册. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 391-398.]

Woods I G, Kelly P D, Chu F, Ngo-Hazelett P, Yan YL, Huang H, Postlethwait JH, Talbot WS. 2000. A comparative map of the zebrafish genome [J]. *Genom Res*, 10: 1903-1914.

Wu RL, Ma CX, Painter I, Zeng ZB. 2002. Simultaneous maximum likelihood estimation of linkage and linkage phases in outcrossing species[J]. *Theor Pop Biol*, 61: 349-363.

Yamashita M, Ojima N, Sakamoto T. 1996. Induction of proteins in response to cold of rainbow trout cells [J]. *FEBS Lett*, **382**: 261-264.

Yang QX, Cao JW, Huang GJ. 1997. Glycosyltransferases and the enzymes of deglycosylation [J]. *Amin Acids Bio tic Resou*, **19**(2): 38-43. [杨清香, 曹军卫, 黄国锦. 1997. 糖基转移酶和去糖基化酶. 氨基酸和生物资源, **19**(2): 38-43.]

Yu ZN, Guo XM. 2003. Genetic linkage map of the eastern oyster *Crussostrea vgialca* Gmelin [J]. *Biol Bull*, **204**: 327-338.

Zhang X, Wu HZ, Wei W, Xu HY, Zhang YX. 2009. Cloning, expression and characterization of antifreeze protein IV-like gene from large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*) [J]. *Food Drug*, **11**(9): 15-19. [张晓, 吴海珍, 卫玮, 徐红艳, 张元兴. 2009. 大黄鱼类 IV 型抗冻蛋白基因的克隆、表达及功能研究. 食品与药品, **11**(9): 15-19.]

Zhu XP, Xia SL, Zhang Y, Liu JZ. 1997. Preliminary study on transgenic mudcarp of antifreeze protein gene [J]. *J Fish Sci Chn*, 4(2): **79**-80. [朱新平, 夏仕玲, 张跃, 刘家照. 1997. 转抗冻蛋白基因鲮鱼的初步研究. 中国水产科学, 4(2): **79**-80.]